

新血小板抑制薬 ,2,2'-Dithiobis(N-2-hydroxypropylbenzamide)の 薬理学的研究

著者	山田 耕二
号	248
発行年	1985
URL	http://hdl.handle.net/10097/15235

氏 名（本籍） やま だ こう じ
山 田 耕 二

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 248 号

学位授与年月日 昭和 60 年 12 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 新血小板抑制薬，2, 2'-Dithiobis (N -
2 -hydroxypropylbenzamide) の薬理学
的研究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教授 佐 藤 進 教授 鶴 藤 丞

教授 鈴 木 康 男

論 文 内 容 要 旨

血栓形成の初発反応は、障害血管壁の内皮下組織への血小板の粘着、凝集であり、血小板は、血栓症に深く関与する。また、血小板は、活性化時に α 顆粒から放出する血小板由来成長因子などを介して動脈硬化の進展にも関与する。このような血小板の病態生理的役割に注目し、血小板抑制薬を、心筋硬塞や脳血管障害をはじめとした血栓性疾患の治療に応用する試みが行われている。

本研究においては、新しい血小板抑制薬の開発を目的として、新規化合物、2, 2'-Dithiobis (N-2-hydroxypropylbenzamide) (KF 4939) の血小板凝集抑制作用および摘出血管収縮抑制作用、ならびに血小板抑制作用の機序について検討した。

2, 2'-Dithiodibenzamide 誘導体の合成研究は、古く 1923 年から報告されているが、その生物活性については、抗真菌作用や駆虫作用が知られているのみであった。数多くの化合物について血小板凝集抑制作用のスクリーニング中に、その誘導体の一つ、2, 2'-Dithiobis (N-morpholinobenzamide) が、強い活性を有することを見出した。そこで、新規および既知の誘導体の血小板凝集抑制作用について調べた結果、アミド基の N 位に、ヒドロキシアルキル、モルフォリンまたはピペラジンを含む置換基を有する化合物が強い活性を示すことが明らかとなった。中でも、2, 2'-Dithiobis (N-2-hydroxypropylbenzamide) (KF 4939) は、経口投与により、最も強い活性を示したので、その薬理作用について詳細な検討を行った。

アスピリンは、血小板抑制薬の中で、これまでに最も広く臨床試験に用いられており、その有用性を認めた報告も多い。しかし、アスピリンの血小板抑制作用は、cyclooxygenase の阻害に起因すると考えられているが、血管壁で、アラキドン酸から cyclooxygenase を介して産生される内因性抗血小板物質；プロスタサイクリンの産生をも阻害する可能性があること、ADP の一次凝集や高濃度トロンビンによる凝集などの cyclooxygenase 代謝物の産生に依存しない凝集反応は抑制しないことなど、抗血栓薬としての有効性になお不十分さを残している。KF 4939 は、in vitro において、ウサギおよびヒト血小板の凝集を、アスピリンに比べて低濃度で抑制し、さらに、アスピリンとは異なり、cyclooxygenase 代謝物に依存しない凝集反応も抑制することが明らかとなった。また、KF 4939 は、経口投与した時、ウサギ ex vivo の系、ラット in vivo の系、およびマウスにおけるアラキドン酸誘発肺血栓モデルにおいて、アスピリンとほぼ同用量で血小板凝集抑制作用を示すことも判明した。これらの事実から、KF 4939 は、アスピリンとは異なる作用機序をもち、広範囲な凝集物質による凝集反応を抑制し、かつ、経口投与可能な新しい血小板抑制薬として、臨床応用が期待出来ると考えられた。

トロンボキサン A_2 (TXA $_2$) は、血小板の活性化時に産生するアラキドン酸代謝物である。

TXA₂ は、強力な血小板凝集作用とともに、強力な血管収縮作用を持っていることから、血栓症のみでなく、冠動脈攣縮の原因物質の1つと考えられており、心筋硬塞発作に、この両作用が密接に関与することが予想されている。KF4939は、TXA₂ による血小板凝集を抑制すること、ウサギ腸間膜動脈およびイヌ冠動脈標本において、TXA₂ による収縮を非競合的に抑制することが明らかとなった。このことは、KF4939が、抗血栓作用に加えて、抗血管攣縮作用をも合わせ持つ薬物となる可能性を示している。また、KF4939は、TXA₂ による収縮の場合に比べて、他の受容体アゴニストによる血管収縮の抑制には、3～10倍の濃度が必要であったことから、TXA₂ の選択的阻害薬であると考えられる。さらに、KCl による収縮は全く抑制しなかったので、電位依存性のカルシウムチャンネルは抑制しないといえる。

KF4939は、既存の血小板抑制薬とは異なった特徴のある薬理学的性質を持っている。次に、その血小板抑制作用の機序の解明を行った。

血小板を、トロンビン、コラーゲンやCa²⁺イオノフォア・A 23187などの刺激物質と反応させると、phospholipase が活性化され、膜リン脂質からアラキドン酸が遊離する。遊離したアラキドン酸は、cyclooxygenase やTXA₂ synthetase により、強力な内因性血小板凝集物質であるTXA₂ に変換される。このリン脂質アラキドン酸代謝系が、血小板凝集や放出反応において重要な役割を果たしていることは広く認められている。そこで、KF4939のアラキドン酸代謝系に及ぼす影響について検討を行った。

KF4939は、トロンビン、コラーゲンおよびCa²⁺イオノフォア・A 23187により活性化された血小板において、膜リン脂質から遊離した内因性アラキドン酸からのマロンジアルデヒド（プロスタグランジンH₂ の分解副生成物でアラキドン酸代謝活性の指標：MDA）やTXA₂ の産生を抑制したが、外因性に加えたアラキドン酸からのMDAやTXA₂ の産生は抑制しなかった。さらに、[¹⁴C]アラキドン酸をあらかじめ膜リン脂質に取り込ませた血小板をトロンビンやCa²⁺イオノフォア・A 23187と反応させて活性化した時の、cyclooxygenase および lipoxigenase の両経路によるアラキドン酸代謝物〔TXB₂（TXA₂ の代謝物）、HHT, 12-HETE〕の産生がいずれもKF4939により抑制された。従って、KF4939は、cyclooxygenase やTXA₂ synthetase の阻害作用は持たず、膜リン脂質からのアラキドン酸遊離を抑制した結果、TXA₂ 産生の減少がもたらされると結論される。

プロスタグランジンE₁（PGE₁）などのcyclic AMP増加作用を有する薬物や、クロルプロマジン（CPZ）などのカルモジュリン阻害作用を有する薬物も、膜リン脂質からのアラキドン酸遊離を抑制することが知られているが、KF4939の作用様式は、これらの薬物とは異なっている。すなわち、KF4939は、トロンビンとA 23187刺激時のアラキドン酸遊離をいずれも抑制したのに対し、PGE₁は、トロンビン刺激時においてのみ抑制作用を示した。またPGE₁とphos-

phodiesterase 阻害薬・テオフィリンの併用時に認められた血小板凝集抑制作用の相乗効果が、KF4939とPG E₁ またはテオフィリンとの併用時には認められなかった。KF4939のトロンビンやA 23187によるMDA産生の阻害活性が、外液Ca²⁺の有無により影響を受けなかったのに対し、CPZのMDA産生阻害活性は、外液Ca²⁺存在下では、非存在下に比べて明らかに弱かった。これらの事実は、KF4939が、cyclic AMPの増加作用やカルモジュリン阻害作用とは別の機序により膜リン脂質からのアラキドン酸遊離を抑制することを示している。

ところで、膜リン脂質からのアラキドン酸遊離の抑制に伴うTX A₂産生の減少は、KF4939の血小板凝集抑制作用の一つの機序と考えることが出来る。しかし、KF4939のTX A₂産生に依存しない凝集に対する抑制作用は、このことのみでは説明出来ず、他の機序の関与が予想出来る。

近年、血小板活性化におけるphospholipase Cによるイノシトールリン脂質代謝の重要性が明らかにされている。すなわち、phospholipase C活性化の結果生成する1, 2-Diacylglycerol (1, 2-DG)は、Ca²⁺およびリン脂質依存性プロテインキナーゼ (Cキナーゼ)の活性化を通してセロトニンなどの放出や凝集に関与する。また、1, 2-DGは、DG lipaseによるアラキドン酸遊離反応の基質としての役割を持っている。従って、phospholipase Cの活性化は、phospholipase A₂による膜リン脂質からの切り出しとともに、アラキドン酸遊離にも関与する。そこで〔¹⁴C〕アラキドン酸を膜リン脂質中に取り込ませた血小板を用いて、KF4939のphospholipase CおよびA₂の活性化に対する作用を検討した。

KF4939は、トロンビン刺激によるホスファチジン酸の産生 (phospholipase C活性化の指標)を抑制した。従って、KF4939は、phospholipase Cの活性化を抑制するといえる。また、トロンビンによる凝集や放出反応は、phospholipase Cを阻害するPG E₁により抑制されたが、アスピリンにより抑制されなかったので、トロンビンによるこれらの反応には、cyclooxygenase代謝物はほとんど関与せず、phospholipase Cの活性化が重要な役割を果たしていると考えられる。従って、KF4939のトロンビン刺激による凝集や放出反応の抑制作用は、主にphospholipase C活性化の阻害に基づくものと考えられる。

一方、KF4939は、phospholipase Cの活性化を伴わず直接phospholipase A₂を活性化すると考えられているA 23187刺激時のアラキドン酸代謝物の産生を抑制したので、phospholipase A₂の活性化をも抑制するものと考えられる。

以上の事実から、KF4939の血小板凝集、放出反応や膜リン脂質からのアラキドン酸遊離の抑制作用は、phospholipase CとA₂の両酵素の活性化の阻害に起因すると説明できよう。

次に、KF4939のこれらの血小板抑制作用の分子機作について、若干の検討を加えた。

KF4939は、ジスルフィド化合物であり、化学的に、SH化合物と容易に反応する性質を持つ

ているので、その血小板抑制作用の分子機作として、血小板中のSH基との反応が関与する可能性が考えられた。この点について検討を行った結果、KF 4939の還元型化合物（Red-KF 4939）の血小板抑制作用が非常に弱いこと、KF 4939の血小板凝集やトロンビン刺激によるMDA産生の抑制作用が、SH化合物の前処置により減弱ないし消失すること、KF 4939と血小板を反応させると、タンパク中のSH基含量が有意に減少すること、が明らかとなった。これらの事実からKF 4939の血小板抑制作用には、ジスルフィド結合が必須の役割を果たしており、血小板のタンパク中のSH基との交換反応によるSH阻害作用が関与するものと考えられる。

以上、本研究においては、KF 4939が、経口投与で有効な抗血管攣縮作用を合わせ持った新しい血小板抑制薬として、臨床応用が期待出来ること、KF 4939の血小板抑制作用が分子内ジスルフィド結合と血小板タンパク中のSH基との交換反応によるSH阻害作用に基づく phospholipase CとA₂の両酵素の活性化の抑制により招来されることを明らかにした。

審 査 結 果 の 要 旨

種々の要因により損傷を受けた血管内皮細胞は血小板を粘着・凝集する。凝集塊の成長は凝固系の活性化を伴って血栓を強化する。過剰の血栓形成は、血管内腔の狭窄、閉塞を招き、その結果、臓器の虚血性病変をもたらすと考えられている。心筋硬塞や脳血管障害のうちで、動脈硬化を基礎病変として持ち、血栓症を直接の発生病因とするものも少なくはない。血小板凝集抑制薬の臨床的応用の試みはアスピリンで代表されるものであるが、比較的限られており、より有効な薬物の開発が待たれている。

本論文は以上の背景を踏まえ、新しい血小板凝集抑制薬の開発を試み、2,2'-Dithiobisbenzamide 誘導体のスクリーニングを行い、就中、最も強力な活性をもつ2,2'-Dithiobis(N-2-hydroxypropylbenzamide) (KF4939)を見出しその薬理学的機序を解析したものである。

KF4939は、①アスピリンに比べ低濃度で広範な凝集惹起物質に対して凝集抑制作用を示すこと、かつ経口投与で有効な血小板凝集抑制作用が発揮されること、②血小板活性化時に産生する内因性血管収縮物質であるトロンボキサン A_2 による血管収縮を比較的選択的に抑制すること、③シクロオキシゲナーゼやトロンボキサン A_2 シンセターゼを阻害しないこと、④フォスホリパーゼCおよびフォスホリパーゼ A_2 の活性化を抑制し、血小板の凝集、セロトニン放出および膜リン脂質からのアラキドン酸遊離を抑制する、⑤上記の抑制作用は血小板のタンパク質中のSH基との相互作用に基づくこと、の諸点を明らかにした。

以上の結果から、KF4939は経口投与で有効な血小板凝集抑制薬として臨床応用が期待されよう。本論文内容は本研究分野にとって有用な情報の提供をも含み、学位論文として価値あるものとする。